

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KADMIUM ÁLTAL INDUKÁLT ÉLETTANI VÁLTOZÁSOK KUKORICÁBAN

PÁL MAGDA

Biológia Doktori Iskola (Dr. Erdei Anna)

Kísérletes Növénybiológia Doktori Program (Dr. Szigeti Zoltán)

Témavezető: Dr. Szalai Gabriella
tudományos főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia
Mezőgazdasági Kutatóintézete

Martonvásár

2009

Bevezetés

A nehézfémek, mint például a kadmium főleg emberi tevékenység során kerülnek a környezetbe. A talaj nehézfém terhelése egyre nagyobb problémát jelent napjainkban. A problémát tovább fokozza, hogy a növényekben felhalmozódó nehézfém közvetlenül vagy közvetve az emberi szervezetbe jut. A növényekben a kadmium számos élettani változást okoz, mint például a növekedésgátlás, a víz- és ionháztartás megváltozása, fotoszintézis gátlás, enzim aktivitásváltozások és szabadgyök képzés.

Kukoricában kadmiumstressz során rövid idő elteltével a fitokelatinok nagy mennyiségben jelennek meg, így a nehézfémstressz hasznos, korai figyelmeztető jelei. A kadmium általában főleg a kukorica gyökerében halmozódik fel, tehát a kadmium megkötése és detoxifikációja a gyökérben lokalizálódik. Lehetséges, hogy az első védelmi vonalban a fitokelatinok és kompartmentalizációjuk szerepelnek. A második védelmi vonalat egyéb rendszerek biztosítják, mint a gyökér kizárási és immobilizáció mechanizmusai, a stresszfehérjék, az antioxidáns enzimek, és a szalicilsav.

Elméleti és gyakorlati szempontból egyaránt nagy jelentőséggel bír azon vegyületek vizsgálata, melyek a növények stressztűrését fokozni képesek. A szalicilsavról eleinte biotikus stresszhatások kapcsán mutatták ki, hogy képes a növények ellenállását növelni. A szalicilsav hatásmechanizmusát vizsgálva megállapították, hogy a kataláz enzimhez kötődik, és ennek során gátolja annak aktivitását. Feltételezhető, hogy a katalázgátlás miatt megnövekedett mennyiségű hidrogénperoxid, mint jelátvivő közvetíti a szalicilsav hatását, és indítja be az akklimatizáció folyamatát, mely a növény nagyobb stressztűrését eredményezi. Valószínű azonban, hogy a szalicilsav számos ponton hatással van az anyagcserére, és nincs egy kitüntetett hatóhelye. Újabban egyre több abiotikus stresszválaszban is bizonyították a szalicilsav szerepét.

Célkitűzések

Munkánk során arra kerestünk választ, milyen védekező mechanizmusok indukálódnak a kukoricánövényekben a kadmiumkezelést követően. Vizsgálni kívántuk továbbá azt is, hogy van-e különbség a levél és a gyökér kadmiumkezelésre adott válaszreakcióiban. Munkánk legfőbb célja az volt, hogy tanulmányozzuk az endogén jelátvivő molekula, a szalicilsav akkumulációját a kukorica kadmiumstresszre adott válaszreakciója során. Ezért a következő vizsgálatok elvégzését tűztük ki célul:

- Annak érdekében, hogy a kadmium indukálta oxidatív stresszt detektáljuk, három stresszmarker értékeinek (klorofilltartalom, lipidperoxidáció és klorofill-*a* fluoreszcencia indukciós paraméter) változásait követjük nyomon.
- Vizsgáljuk, a kadmiumkezelés során hogyan változik a membránpermeabilitás, ezért mérjük a különböző membránfrakciók zsírsavösszetételének, kettőskötés indexének, valamint a telítetlenségi százalék értékének változásait.
- Az antioxidáns védekezőrendszert vizsgálva meghatározzuk a kataláz, az aszkorbát-peroxidáz, a glutation-S-transzferáz, a glutation-reduktáz és a gvajakol-peroxidáz enzimek aktivitásában bekövetkező változásokat.
- Mérjük a kéntartalmú vegyületek mennyiségi változásait. Vizsgáljuk a glutation és annak prekursorainak (cisztein és γ -glutamilcisztein), valamint a nehézfémstressz hasznos és korai figyelmeztető jelének a fitokelatinok szintézisének indukcióját, továbbá a fitokelatin szintáz szövetspecifitását. Összefüggést keresünk az *in vivo* fitokelatin szint és az *in vitro* fitokelatin szintáz aktivitásának változásai között.
- Megvizsgáljuk a szalicilsav (szabad és konjugált formájának) akkumulációját kadmiumkezelést követően. Továbbá lehetséges prekursorainak mennyiségi analízise során arra keressük a választ, hogy kukoricában kadmiumstressz során a szalicilsav milyen útvonalon szintetizálódhat.

Anyag és módszer

Növényi anyag, növénynevelés, kadmiumkezelés paramétere

A kukorica (*Zea mays* L., Norma hibrid) növényeket a Pál és mtsai (2005) által leírt körülmények között neveltük a martonvásári Mezőgazdasági Kutatóintézet fitotronjában.

A kadmiumkezelés hatásának vizsgálatához a 10 napos növénykéek tápoldatát 0, 10, 25 és 50 μM koncentrációkban $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -ot tartalmazóra cseréltük. A kadmiumkezelés 7 napig tartott. Vizsgálatainkat a harmadik teljesen kifejtett levélen, illetve a gyökéren végeztük.

Klorofilltartalom mérése

A teljes klorofilltartalom meghatározásához SPAD-502 klorofillmérő berendezést használtunk. A méréseket a kadmiumkezelés kezdetétől számított 1, 4 és 7 nap elteltével végeztük.

Lipidperoxidáció meghatározása

A lipidperoxidáció meghatározása a malondialdehid tartalom mérésén alapszik, mely spektrofotometriásan történt Thomas és mtsai (2004) által leírtak szerint. A mintavételt a kadmiumstressz 1., 4. és 7. napján végeztük.

Klorofill fluoreszcencia indukció mérése

A $\Delta F/F_m'$ klorofill fluoreszcencia indukciós paramétert Janda és mtsai (1994) által leírtak szerint PAM-2000 típusú fluorométerrel mértük a kadmiumkezelés 7. napján.

Lipid extrakció és zsírsav analízis

A lipid extrakció, a lipid frakciók szétválasztása, a zsírsavak metilészterezése és GC analízise Pál és mtsai (2007) által leírtak szerint történt. A mintavétel a kadmiumkezelés 7. napján történt.

Cisztein-, γ -glutamilcisztein- és glutationtartalom meghatározása

A tiol vegyületek HPLC analízise Kocsy és mtsai (2004) módszere alapján történt. A mintavétel a kadmiumos kezelés 1., 4. és 7. napján történt.

Antioxidáns enzimek kivonása és aktivitás mérése

Az enzimkivonás, és a különböző antioxidáns enzimek aktivitásának spektrofotometriás meghatározása Janda és mtsai (1999) szerint történt. A mintavétel a kadmiumos kezelés 4. és 7. napján történt.

Fitokelatin szintáz izolálás és aktivitásmérés

Az *in vivo* fitokelatin szintáz HPLC analízise és az *in vitro* fitokelatin szintáz aktivitás meghatározása Chen és mtsai (1997) szerint történt. A mintavétel a kadmiumos kezelés 1., 4. és 7. napján történt.

Szalicilsav extrakció és mennyiségi analízis

A szalicilsav HPLC analízisét Meuwly és Métraux (1993) által leírt módszer szerint végeztük. A mintavétel a kadmiumos kezelés 4. és 7. napján történt.

Statisztikai analízis

Az eredmények 10 ismétlés átlagai a klorofill-*a* fluoreszcencia indukciós mérések és a klorofilltartalom esetében, 5 ismétlés átlagai a malondialdehid-tartalom meghatározása, és a HPLC analízisek során, 3 – 5 mérés átlagai az enzimaktivitási adatok, illetve 3 mérés átlagai a GC analízis eredményei. A szignifikancia vizsgálatához Student-féle kétmintás t-próbát használtunk.

Eredmények és következtetések

- Munkánk során kimutattuk, hogy az általunk vizsgált kísérleti körülmények között, a kadmiumkezelésre a kukoricanövény levele és gyökere eltérő módon reagált.
- A levélben a kadmium oxidatív stressz indukált, amit a klorofilltartalom, a klorofill-*a* indukciós paraméter csökkenése és a malondialdehid-tartalom megemelkedése kísért, addig a gyökérben nem volt kimutatható az oxidatív stressz tünete.
- Kimutattuk, hogy a kadmiumkezelés hatására kukoricában, a levélben a foszfatidil-glicerid és a foszfatidil-etanolamin, míg a gyökérben valamennyi

vizsgált lipidfrakcióban a rövid szénatomszámú, telített zsírsavak mennyiségének csökkenésével nőtt a hosszabb szénatomszámú, telítetlen zsírsavak aránya. A többszörösen telítetlen zsírsavak mennyiségével arányosan a membrán fluiditása megemelkedik, és ez felelős lehet a kadmium gyors felvételéért és transzlokálódásáért kukoricában. A magasabb kadmiumkoncentrációnál a lipidfrakciók telítetlenségének növekedésében bekövetkező visszaesés, a membránfluiditás növekedésének kadmium általi gátlásából adódhat.

- Eredményeink azt mutatták, hogy a kadmiumkezelés hatására indukálódó védekező mechanizmusok szintén eltérő módon és mértékben aktiválódtak a kukorica levelében, illetve gyökerében.
- A levélben a kadmium indukálta oxidatív stressz hatására a glutation-reduktáz és a gvajakol-peroxidáz enzimek aktiválódtak, míg a gyökérben nem tapasztaltuk az antioxidáns enzimek indukcióját.
- A kadmiumkezelés nem volt kifejezetten hatással a levél glutationtartalomra, de a gyökér glutationszint a kadmiumkezelés során idő- és koncentrációfüggő módon csökkent.
- A kadmiumkezelés hatására az *in vivo* fitokelatin (PC2) szint megemelkedett a kukorica gyökerében, ami összefüggésben van a gyökér glutationszint drasztikus csökkenésével. A megemelkedett fitokelatin szint felelős lehet a kadmium hatékony detoxifikálásában, vakuoláris kompartmentalizációjában a gyökérben.
- A gyökérben a kontrollhoz képest az *in vitro* fitokelatin szintáz aktivitás csökkenését tapasztaltuk, ami a fitokelatinok gyors akkumulációjával magyarázható. Eredményeink megerősítik azt a feltételezést, hogy míg a gyökérben a fitokelatin szintáz enzim jelenléte konstans, addig a levélben a kadmium jelenléte szükséges a szintézisének indukciójához.
- Először mutattuk ki, hogy a kadmium a kukorica levélben benzoesav, szalicilsav és *o*-hidroxifahéjsav felhalmozódást indukált mind szabad, mind kötött formában, és a megemelkedett szalicilsav szintézis feltételezhetően benzoesavon keresztül történt. A gyökérben az 50 μM -os kezelés drasztikusan megemelte a

szabad *o*-hidroxi-fahéjsav szintjét és kismértékben csökkentette a kötött benzoésav szintjét. A levélben tapasztalt szalicilsav akkumuláció esetünkben inkább tekinthető a kadmium okozta oxidatív stressz részének, mint védekező mechanizmusnak, mivel a többi vizsgált védelmi mechanizmus indukciójában nem volt szerepe.

- A levélben és a gyökérben is megfigyelt, szalicilsav szintézisétől független *o*-hidroxi-fahéjsav felhalmozódás az antioxidáns védekező mechanizmus része lehet.

Irodalomjegyzék

- Chen, J., Zhou, J., Goldsbrough, P.B. (1997): Characterization of phytochelatase synthase from tomato. *Physiol. Plant.*, 101: 165-172.
- Janda, T., Szalai, G., Kissimon, J., Páldi, E., Marton, C., Szigeti, Z. (1994): Role of irradiance in the chilling injury of young maize plants studied by chlorophyll fluorescence induction measurements. *Photosynthetica*, 30: 293-299.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I., Páldi, E. (1999): Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effect of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*, 208: 175-180.
- Kocsy, G., Szalai, G., Sutka, J., Páldi, E., Galiba, G. (2004): Heat tolerance together with heat stress-induced changes in glutathione and hydroxymethylglutathione levels is affected by chromosome 5A of wheat. *Plant Sci.*, 166: 451-458.
- Meuwly, P., Métraux, J. P. (1993): Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal. Biochem.*, 214: 500-505.
- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2005): Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (*Zea mays* L.) plants. *Physiol. Plant.*, 125: 356-364.
- Pál, M., Leskó, N., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2007): Cadmium-induced changes in the membrane lipid composition of maize plants. *Cereal Res. Commun.*, 35: 1631-1642.
- Thomas, J.C., Perron, M., Davies, E.C. (2004): Genetic responsiveness to copper in the ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Sci.*, 167: 259-266.

A tézisek alapjául szolgáló, referált tudományos folyóiratban

megjelent publikációk

1. **Pál, M.**, Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2005): "Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (*Zea mays* L.) plants". **Physiol. Plant.**, 125: 356-364.
2. **Pál, M.**, Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2006): "Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize". **J. Plant Nutr. Soil Sci.**, 169: 239-246.
3. **Pál, M.**, Leskó, N., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2007): "Cadmium-induced changes in the membrane lipid composition of maize plants". **Cereal Res. Comm.**, 35: 1631-1642.

Konferenciakiadványok

1. **Pál, M.**, Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2004): "Cadmium stimulate accumulation of salicylic acid and *ortho*-coumaric acid in maize". **Acta Physiol. Plant.**, The 14th FESPB Congress Book of Abstract, Vol. 26, No. 3, 238.
2. **Pál, M.**, Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2006): "The effect of cadmium stress on phytochelatin, thiol and polyamine content in maize". V. Alps-Adria Scientific Workshop Opatija, 2006. **Cereal Res. Comm.**, 34: 65-68.

Egyéb, a témához közvetlenül nem kapcsolódó, referált tudományos

folyóiratban megjelent publikációk

1. **Pál, M.**, Nagy, E. (2002): "Chilling tolerance in maize". Review. **Acta Agron. Hung.**, 50: 95-106.
2. Horváth E., Szalai G., **Pál M.**, Páldi E., Janda T. (2003): "A szalicilsav szerepe az abiotikus stressztolerancia kialakulásában". **Botanikai Közlemények.** 90: 103-112.

3. Hörcsik T. Z., Szalai G., **Pál M.**, Oláh V., Mészáros I., Lakatos G., Balogh Á. (2003): "Fitokelatinok előfordulása *Chlorella pyrenoidosa* zöldalgában Cr(VI) stressz hatására". **Hidrológiai Közlöny** 84: 50-52.
4. Janda, T., Szalai, G., Papp, N., **Pál M.**, Páldi, E. (2004): "Effects of freezing on thermoluminescence in various plant species". **Photochem. Photobiol.** 80: 525-530.
5. Szalai, G., **Pál M.**, Horváth, E., Janda, T., Páldi, E.: (2005) "Investigations on the adaptability of maize lines and hybrids to low temperature and cadmium". **Acta Agron. Hung.**, 53: 183-196.
6. Horváth, E., **Pál M.**, Szalai, G., Páldi, E., Janda, T. (2007): "Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat (*Triticum aestivum* L.) plants". **Biol. Plant.**, 51: 480-487.
7. Rácz, I., Páldi, E., Szalai, G., Janda, T., **Pál M.**, Lásztity, D. (2008) "Effect of S-methylmethionine on membrane integrity in higher plants exposed to low temperature stress". **J. Plant Physiol.**, 165: 1483-1490.

Konferenciakiadványok

1. **Pál M.**, Szalai, G., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E. (2002): "Effect of salicylic acid during heavy metal stress". **Acta Biol. Szeged.**, Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology, 46: 119-120.
2. Horváth, E., Szalai, G., **Pál M.**, Páldi, E., Janda, T. (2002): "Differences between the catalase isozymes of maize (*Zea mays* L.) in respect of inhibition by various phenolic compounds". **Acta Biol. Szeged.**, Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology, 46: 33-34.
3. Páldi, E., Szalai, G., Marton, C.L., **Pál M.**, Janda, T. (2002): "Role of some N-containing compounds in chilling tolerance of maize". **Acta Biol. Szeged.**, Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology, 46: 99-100.

4. Páldi E., Rácz I., Szalai G., Janda T., Horváth E., **Pál M.**, Lásztity D. (2003): "Az S-metilmetionin hatása a membránstabilitásra termesztett növényfajokban alacsony hőmérsékleten". In: (szerk. Csorba Zs., Jolánkai P., Szöllősi G.) **III. Növénytermesztési Tudományos Nap.** Budapest. pp. 193-197.
5. **Pál M.**, Szalai G., Horváth E., Janda T., Páldi E.(2003) "Szalicilsav hatása kadmiumstressz során kukorica növényekben". In: (szerk. Csorba Zs., Jolánkai P., Szöllősi G.) **III. Növénytermesztési Tudományos Nap.** Budapest. pp. 411-414.
6. Szalai, G., Gyetvai, E., Lásztity, D., Rácz, I., **Pál, M.**, Horváth, E., Janda, T., Páldi, E. (2003): "Kukorica vonalak toxikus fémekkel és alacsony hőmérséklettel szembeni adaptációs képességének tanulmányozása". In: (szerk. Nagy J.): **Kukoricakonzorcium: Kukorica hibridek adaptációs képességének és termésbiztonságának javítása.** DE ATC, Debrecen. pp. 24-30.
7. Horváth, E., **Pál, M.**, Szalai, G., Páldi, E., Janda, T.(2004): "Wheat seedlings protected against drought stress by exogenous 4-hydroxybenzoic acid, but not by salicylic acid". **Acta Physiol. Plant.,** The 14th FESPB Congress Book of Abstract, Vol. 26, No. 3, 236.
8. Szalai, G., **Pál, M.**, Páldi, E., Janda, T. (2004): "Effect of salt stress on the endogen salicylic acid content in maize (*Zea mays* L.) plants". **Acta Physiol. Plant.,** The 14th FESPB Congress Book of Abstract, Vol. 26, No. 3, 237.
9. Rácz, F., Hidvégi, Sz., Záborszky, S., **Pál, M.**, Marton, L.Cs. (2006) Pollen production of new generation inbred maize lines. V. Alps-Adria Scientific Workshop Opatija, 2006. **Cereal Res. Comm.** 34: 633-636.